

10/543078

382.1047

JC18 Rec'd PCT/PTO 21 JUL 2005

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Re: Application of: Michinori KOHARA, et al.
International
Appl. No.: PCT/JP04/000605
Filed: Herewith
For: **OLIGORIBONUCLEOTIDE OR PEPTIDE NUCLEIC
ACID INHIBITING FUNCTION OF HEPATITIS C
VIRUS**

Mail Stop: PCT
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

July 21, 2005

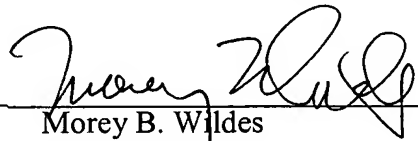
LETTER RE: PRIORITY

Sir:

Applicants hereby claim priority for the above-identified application from Japanese Patent Application No. 2003-016750 filed January 24, 2003, through International Application No. PCT/JP04/000605, filed January 23, 2004.

Respectfully Submitted,

DAVIDSON, DAVIDSON & KAPPEL, LLC

By: 
Morey B. Wildes
Reg. No. 36,968

Davidson, Davidson & Kappel, LLC
485 Seventh Avenue, 14th Floor
New York, New York 10018
(212) 736-1940

PCT/JP 2004/000605

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

23. 1. 2004

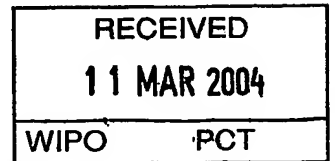
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 3 年 1 月 2 4 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 0 1 6 7 5 0
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 0 1 6 7 5 0]

出 願 人
Applicant(s): 財団法人 東京都医学研究機構
中外製薬株式会社

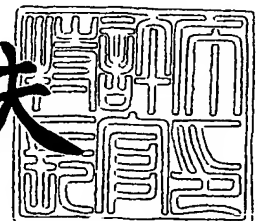


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 2 月 2 6 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 1 3 6 7 3

【書類名】 特許願

【整理番号】 P03-0030

【提出日】 平成15年 1月24日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 31/7088

【発明の名称】 C型肝炎ウイルスの働きを阻害するオリゴリボヌクレオチドまたはペプチド核酸

【請求項の数】 10

【発明者】

【住所又は居所】 東京都北区田端 3 - 1 5 - 3 - 4 0 8

【氏名】 小原 道法

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区本駒込 4 - 1 6 - 1 3 - 2 0 3

【氏名】 渡邊 綱正

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東 2 - 4 - 3

【氏名】 多比良 和誠

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県我孫子市我孫子 1 2 1 - 1 スカイヒルズ我孫子 5 0 3 号室

【氏名】 宮岸 真

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県鎌倉市梶原 2 0 0

【氏名】 須藤 正幸

【特許出願人】

【識別番号】 591063394

【氏名又は名称】 財団法人 東京都医学研究機構

【特許出願人】

【識別番号】 000003311

【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100118773

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤田 節

【選任した代理人】

【識別番号】 100112346

【弁理士】

【氏名又は名称】 内藤 由美

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0217168

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 C型肝炎ウイルスの働きを阻害するオリゴリボヌクレオチドまたはペプチド核酸

【特許請求の範囲】

【請求項1】 C型肝炎ウイルス（HCV）のRNAに対して配列特異的に結合するオリゴリボヌクレオチドまたはペプチド核酸。

【請求項2】 HCVのRNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズする請求項1に記載のオリゴリボヌクレオチドまたはペプチド核酸。

【請求項3】 HCVのRNAの5'非翻訳領域の配列とハイブリダイズすることを特徴とする請求項1に記載のオリゴリボヌクレオチドまたはペプチド核酸。

【請求項4】 遺伝子型の異なる複数種のHCVの遺伝子配列において、同一性の高い領域の配列とハイブリダイズすることを特徴とする、請求項1に記載のオリゴリボヌクレオチドまたはペプチド核酸。

【請求項5】 二本鎖RNAである請求項1に記載のオリゴリボヌクレオチドまたはペプチド核酸。

【請求項6】 鎖長が19～23bpである、請求項1に記載のオリゴリボヌクレオチドまたはペプチド核酸。

【請求項7】 配列番号20～34に示すヌクレオチド配列を有するオリゴリボヌクレオチド。

【請求項8】 請求項1～7に記載のオリゴリボヌクレオチドを発現するベクター。

【請求項9】 請求項1～7に記載のオリゴリボヌクレオチド若しくはペプチド核酸、または請求項8に記載のベクターを有効成分とするC型肝炎治療剤。

【請求項10】 請求項1～7に記載のオリゴリボヌクレオチドまたはペプチド核酸をHCV-RNAに結合させて、HCVの複製能を阻害する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、C型肝炎ウイルスの働きを阻害するオリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸、該オリゴヌクレオチドを発現するベクター、これらを有効成分とするC型肝炎治療剤、並びに該オリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸をHCV-RNAに結合させてHCVの複製能を阻害する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

C型肝炎ウイルス（以下「HCV」という）は、輸血後の非A非B型肝炎の主要な原因ウイルスであり、その遺伝子のcDNAは1989年にクローニングされた。これまでにクローニングされた遺伝子cDNAを用いてHCVに関する多くの研究が行われており、特に感染予防ならびに診断法の確立など社会的に重要な成果が達成され、現在では輸血後のHCV感染はほとんど認められない状況に至っている。しかしながら、世界中のHCV感染者数は全人口の数%にもおよぼされている。

【0003】

一方、近年、動物の生体内における細胞内での特定の遺伝子の発現を抑制する方法として、標的遺伝子に対する二本鎖RNAを用いて標的遺伝子の発現を抑制する方法が見出された（例えば非特許文献1参照）。この方法はRNAインターフェアランス(RNAi)と呼ばれ、二本鎖RNA(dsRNA)を細胞内に導入した際に、そのRNA配列に対応する細胞内のmRNAが特異的に分解され、蛋白質として発現されなくなる現象をいう。RNAiは、新規遺伝子の機能を遺伝子発現阻害により調べる上で有効な方法であり、線虫、ショウジョウバエなどの遺伝子機能解析に盛んに用いられている。

【0004】

【非特許文献1】

ファイア (Fire A) ら 「ネイチャー (Nature)」 (英国) 1998年 391 巻 p.806-811

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

HCVに起因する感染は長期慢性化する特徴があり、これに伴い慢性肝炎を引

き起こし、その後肝硬変、さらに肝癌に移行する割合が非常に高いことが知られており、感染後のHCVの確実な治療が重要な課題となっている。

【0006】

C型慢性肝炎の治療法については、インターフェロン（IFN）療法が広く施行されているが、有効率が約30%であること、高頻度に発熱などの副作用が誘導されること、高薬価であることなどの問題が存在している。IFNの種類、用法・用量の検討もなされ、コンセンサスIFNの開発などにより有効率の向上も期待され、また、IFNとリバビリンなどの抗ウイルス剤の併用による治療も試みられているが、現在までのところいずれも確実な治療法には至っていない。

【0007】

また、RNAiが病気の治療、特にC型肝炎などのウイルス性疾患の治療に有効であるか否かは不明であった。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、鋭意研究を進めた結果、HCV-RNAに対して配列特異的に結合するオリゴリボヌクレオチド（以下「オリゴRNA」という）またはペプチド核酸が、HCVの複製を阻害することを見出し、本発明を完成した。

【0009】

すなわち本発明は、以下の（1）～（10）を提供する。

- （1） C型肝炎ウイルス（HCV）のRNAに対して配列特異的に結合するオリゴリボヌクレオチドまたはペプチド核酸。
- （2） HCVのRNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズする（1）に記載のオリゴリボヌクレオチドまたはペプチド核酸。
- （3） HCVのRNAの5'非翻訳領域の配列とハイブリダイズすることを特徴とする（1）に記載のオリゴリボヌクレオチドまたはペプチド核酸。
- （4） 遺伝子型の異なる複数種のHCVの遺伝子配列において、同一性の高い領域の配列とハイブリダイズすることを特徴とする、（1）に記載のオリゴリボヌクレオチドまたはペプチド核酸。
- （5） 二本鎖RNAである（1）に記載のオリゴリボヌクレオチドまたはペプ

チド核酸。

(6) 鎖長が19~23bpである、(1)に記載のオリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸。

(7) 配列番号20~34に示すヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチド。

(8) (1)~(7)に記載のオリゴヌクレオチドを発現するベクター。

(9) (1)~(7)に記載のオリゴヌクレオチド若しくはペプチド核酸、または(8)に記載のベクターを有効成分とするC型肝炎治療剤。

(10) (1)~(7)に記載のオリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸をHCV-RNAに結合させて、HCVの複製能を阻害する方法。

【0010】

【発明の実施の形態】

本発明のHCV-RNAに対して配列特異的に結合するオリゴRNAは、糖としてリボースを有するオリゴヌクレオチドであり、塩基としては、天然のRNA中に存在するアデニン、グアニン、シトシン、ウラシルの他、チミン、並びに他の修飾塩基等を含むものも包含する。本発明のオリゴRNAは、HCV-RNAに配列特異的に結合可能なオリゴRNAであれば特に制限されないが、HCVの複製能を阻害するオリゴRNAであることが好ましい。例えば、HCV-RNAの配列と相補的な配列を有するオリゴRNA、HCV-RNAの配列と相補的な配列と高い同一性を示す配列を有するオリゴRNA、HCV-RNAの配列を有するRNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能なオリゴRNA等を挙げることができる。尚、本発明は特定の理論に拘束されるものではないが、本発明の好ましい一態様であるsiRNAは、標的遺伝子にハイブリダイズしてダイサーを介して標的遺伝子を切断するものであり、標的遺伝子は19~23ntの長さに切断されると考えられている。一方、本発明の他の態様であるアンチセンス核酸は、標的遺伝子にハイブリダイズしてIFNを誘導し、RNaseを活性化することによって標的遺伝子を分解すると考えられている。あるいは、結合によって標的RNAの構造変化を起こして翻訳を阻害すると考えられている。また、本発明において、HCV-RNAの配列とは、HCVのゲノムRNA(一鎖)の配列、ゲ

ノムRNAから転写されたmRNA（＋鎖）の配列のいずれでも良いが、好ましくは＋鎖の配列である。

【0011】

本発明において高い同一性とは、70%以上の同一性であり、好ましくは80%以上の同一性であり、さらに好ましくは90%以上の同一性（例えば95%以上の同一性）である。塩基配列の同一性は、Karlin and AltschulによるアルゴリズムBLAST(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993)等によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTNやBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている(Altschul et al. J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)。BLASTに基づいてBLASTNによって塩基配列を解析する場合には、パラメーターはたとえばscore = 100、wordlength = 12とする。また、BLASTに基づいてBLASTXによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターはたとえばscore = 50、wordlength = 3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

【0012】

ハイブリダイゼーション技術 (Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989、など) は当業者によく知られた技術であり、ストリンジェントな条件下も当業者であれば適宜選択することが可能である。ストリンジェントな条件の例としては、例えば、ハイブリダイゼーション後の洗浄において42℃、5×SSC、0.1%SDSの条件であり、好ましくは50℃、5×SSC、0.1%SDSの条件であり、さらに好ましくは65℃、0.1×SSC及び0.1%SDSの条件である。但し、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響する要素としては温度や塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

【0013】

本発明のオリゴRNAは一本鎖であっても、二本鎖であってもよく、又、さらに二本以上の複数の鎖から形成されていてもよいが、好ましいのは二本鎖である

。二本鎖は独立した2本の鎖から形成されていてもよいし、又、自己相補的な一本鎖RNA中で形成される二本鎖であってもよい。オリゴRNAが二本鎖の場合、全ての領域において二本鎖を形成していてもよいし、一部の領域（例えば両末端又は片方の末端など）が一本鎖等になっていてもよい。

【0014】

本発明のオリゴRNAは、HCV-RNAへの配列特異的結合能を有していればよく、その長さは限定されない。本発明のオリゴRNAの長さとしては、例えば、5～1000塩基（二本鎖の場合には、5～1000bp）であり、好ましくは10～100塩基（二本鎖の場合には、10～100bp）であり、さらに好ましくは15～25塩基（二本鎖の場合には、15～25bp）であり、特に好ましくは19～23塩基（二本鎖の場合には、19～23bp）である。本発明において好ましいオリゴRNAは、配列番号20～34に示すヌクレオチド配列を有するオリゴリボヌクレオチドであり、特に好ましいものとして配列番号20～25に示すヌクレオチド配列を有するオリゴリボヌクレオチドが挙げられる。

【0015】

HCVは約340ヌクレオチドの非翻訳領域（5'非翻訳領域）、約9400ヌクレオチドからなるオープン・リーディング・フレーム（ORF）、約50ヌクレオチドからなる非翻訳領域（3'非翻訳領域）で構成されている。本発明のオリゴRNAがターゲットとする部位は特に限定されず、どの部位でもよいが、好ましくは5'非翻訳領域～ORFの5'末端領域（例えば、配列番号1～11に示す塩基配列を有する領域）、3'非翻訳領域（例えば、配列番号12～19に示す塩基配列を有する領域）であり、特に好ましくは5'非翻訳領域である。

【0016】

HCVの5'非翻訳領域には、インターナル・リボソーム・エントリー・サイト（Internal Ribosomal Entry Site：IRES）やステムループを形成するステム領域などが存在する。HCVの5'非翻訳領域やIRES、ステム領域については既に多くの報告がある（Kato, N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 87, 9524-9528, (1990)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 88, 2451-2455, (1991)、J. Virol., 65, 1105-1113, (1991)、J. Gen. Virol., 72, 2697-2704, (1991)、Virology

gy, 188, 331-341, (1992)、Tsukiyama. Kohara. et al., J. Virol., 66, 1476-1483, (1992)、Honda Masao. et al., J. Virol., 73, 1165-1174, (1999)、Honda Masao et al., RNA, 2(10), 955-968, (1996)、Sasano T. et al., Genome Inf. Ser., 9, 395-396, (1998)、Ito T et al., J. Virol., 72, 8789-8796, (1998)、Kamoshita N et al., Virology., 233, 9-18, (1997)、など)。図1及び図2に、HCV RNAの5'非翻訳領域及び3'非翻訳領域における一般的な二次構造を示す。

【0017】

また、HCVは遺伝子型の異なる複数のHCVが存在する。そのようなHCVの例としては、例えば、HCJ6、HCJ8、HCV-1、HCV-BK、HCV-J、JCH1、JCH3、JFH1、R24、R6、S14J、pH77J6S (GenBank Accession no. AF177039)、HCJ6CH、2b_A B030907などが挙げられる。このような遺伝子型の異なる複数のHCV-RNAに対応する為には、遺伝子型の異なる複数のHCV遺伝子配列の中で同一性が高い領域をターゲットにすることが好ましい。ここで、遺伝子型の異なる複数のHCV遺伝子配列の中で同一性が高い領域とは、複数のHCV配列がお互いに80%以上の同一性、好ましくは90%以上の同一性、さらに好ましくは95%以上の同一性を有する領域である。そのような領域は、10塩基以上の長さを有していることが好ましく、さらに好ましくは15塩基以上、特に好ましくは20塩基以上の長さを有する。ここで、複数のHCVとは、通常、3種類以上のHCV、好ましくは5種類以上、特に好ましくは10種類以上のHCVのことをいう。

【0018】

本発明で用いられるオリゴリボヌクレオチドは特に限定されず、修飾されていない通常のRNAの構成を有するものの他に、リン酸ジエステル部や糖部などを修飾した修飾RNAなどを用いることも可能である。又、本発明のオリゴRNAは、その一部分にデオキシリボヌクレオチドなどのリボヌクレオチドでない分子を含んでいてもよい。

【0019】

本発明においては、オリゴRNAの変わりにペプチド核酸(PNA)などを用いてもよい。PNAは当業者によく知られた技術であり(Nielsen Peter E., Met

hods in Molecular Biology, 208, 3-26, (2002)、Braasch Dwaine A et al., Biochemistry, 41(14), 4503-4510, (2002)、Koppelhus Uffe et al., Antisense Drug Technology, 359-374, (2001)、Nielsen Peter E., Methods in Enzymology, 340, 329-340, (2001))、上記オリゴRNAと同様に、配列特異的にHCV-RNAに結合し得るものを製造できる。

【0020】

本発明のオリゴRNAまたはペプチド核酸は当業者に公知の方法で作製することが可能である。

【0021】

本発明のオリゴRNAを継続的に発現させる場合には、本発明のオリゴRNAを発現するベクターを作製してもよい。ベクターは当業者に公知の方法で作製することが可能である。例えば、Nature Biotech (2002) 19, 497-500に記載されたもの等の公知のベクターに本発明のオリゴRNAをコードする遺伝子を導入することにより作製することが可能である。

【0022】

本発明のオリゴRNAは、HCVの複製を阻害し、HCVの増殖を抑制することが可能であるので、C型肝炎の治療剤として有用である。この場合、複数種類のHCVに対応するオリゴリボヌクレオチドまたはペプチド核酸を提供することで、臨床の場において患者が感染しているウイルスの型を同定することなく治療でき、また複数種のオリゴリボヌクレオチドまたはペプチド核酸を混合して用いる必要もなくなるので好ましい。

【0023】

本発明のオリゴRNAまたはペプチド核酸を有効成分とするC型肝炎治療剤は、必要に応じて、賦形剤、等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、無痛化剤等を加えて錠剤、散財、顆粒剤、カプセル剤、リポソームカプセル剤、注射剤、液剤、点鼻剤など、さらに凍結乾燥剤とすることができる。これらは常法にしたがって調製することができる。又、本発明のオリゴRNAを発現するベクターを投与することも可能である。

【0024】

本発明のオリゴRNAまたはペプチド核酸は患者の患部に直接適用するか、又は血管内に投与するなどして結果的に患部に到達し得るように患者に適用する。さらには、持続性、膜透過性を高める封入素材を用いることもできる。例えば、リポソーム、ポリ-L-リジン、リピッド、コレステロール、リポフェクチン又はこれらの誘導体が挙げられる。

【0025】

本発明のオリゴRNAまたはペプチド核酸の投与量は、患者の状態に応じて適宜調整し、好ましい量を用いることができる。例えば、0.001~100mg/kg、好ましくは0.1~10mg/kgの範囲で投与することができるが、特に限定するものではない。

【0026】

【実施例】

実施例1 siRNAの標的とする領域の決定

C型肝炎ウイルスの多くの分離株の中で遺伝子を構成している塩基配列、特に5'側の非翻訳領域からコア領域および3'側の非翻訳領域において相同性が高い領域を見出すために、配列の比較を行った。

【0027】

図3にHCVの分離株であるHCV-1 (GenBank Accession no. M62321)、HCV-BK (Accession no. M58335)、HCV-J (Accession no. D90208)、R6 (Accession no. AY045702)、R24、S14J、HCJ6、JFH1 (Accession no. AB047639)、JCH1 (Accession no. AB047640)、JCH3 (Accession no. AB047642)、HCJ8 (Accession no. D10988) のRNAの5'側の非翻訳領域からコア領域の500塩基についてのcDNA配列を示す。これらの塩基配列について、当分野において通常行われる方法を用いてマルチプルアライメントを行った。結果を図4に示す。また、HCVの5'側の少なくとも10種の型のHCVにおいて同一性が95%以上である領域から、この領域を標的として配列特異的に結合し得るsiRNAを設計した。

【0028】

同様に、図5に示したpH77J6S (Accession no. AF177039)、R6、R24L、R24S、HCJ6CH (Accession no. AF177036)、JFH1、JCH1、2b_AB030907 (Accession n

o. AB030907) の配列から、同様に3'側の非翻訳領域についてマルチプルアライメントを実施し、少なくとも8種の型のHCVにおいて同一性が95%以上である領域から、この領域を標的として配列特異的に結合し得るsiRNAを設計した。

【0029】

尚、siRNAは、上記配列同一性を考慮して設計する他、翻訳開始部位直前で設計することが好ましい。更に、標的となるHCV RNAの二次構造をも考慮して設計することが好ましい。特に、5'及び3'UTRのループ構造及びその近傍を標的とすることができる。

【0030】

実施例2 siRNA合成

実施例1の結果に基づいて、目的のHCV全ゲノムに対して21ntの長さでsiRNAの配列を設計し、Silencer siRNA Construction Kit(Ambion cat. no. 1620)のプロトコールに従い、3'末端にT7プロモーター配列を含むオリゴヌクレオチドを合成した。鋳型となる各オリゴヌクレオチドを100 μ Mに調製後、T7プライマーとハイブリダイズさせ、その後Klenow酵素にて2本鎖DNAとしてT7プロモーターを用いて転写させた。合成されたRNAを各々の相補鎖とアニーリングさせて2本鎖RNAとした後、残存する1本鎖の突出末端をRNaseにより切断し、siRNAを作成した。最終的に合成された15~30 μ g/reactionのsiRNAをRNase freeの水にて10 μ Mに調製し、12% アクリルアミドゲル電気泳動にて21塩基の二本鎖RNAを確認後、使用時まで-80℃に保存した。

【0031】

合成したsiRNA配列を以下に示す。尚、これらの配列が対応するHCV (R6株) の配列 (Accession no. AY045702) 中のヌクレオチド番号を併せて示す。

1) 5'-UTR を標的とする siRNA

| | |
|---|---------------------|
| R1-siRNA; 5'-GGAACUACUGUCUUCACGCAG-3' (21) | (配列番号 20、53-73nt) |
| R2-siRNA; 5'-GCCAUAGUGGUCUGCGGAACC-3' (21) | (配列番号 21、139-159nt) |
| R3-siRNA; 5'-AGCCCUUGUGGUACUGCCUGAU-3' (22) | (配列番号 22、278-299nt) |
| R5-siRNA; 5'-GUCUCGUAGACCGUGCAUCA-3' (20) | (配列番号 23、325-344nt) |
| R6-siRNA; 5'-GCGAAAGGCCTTGTGGTACTG-3' (21) | (配列番号 24、273-293nt) |

R7-siRNA; 5'-GTCTCGTAGACCGTGCACCA-3' (20) (配列番号 25、325-344nt)
R5L-siRNA; 5'-GUCUCGUAGACCGUGCAUCAT-3' (21) (配列番号 26、325-345nt)
R1mut-siRNA; 5'-GGAACUACUGUCUUCACGCAG-3' (21) (配列番号 27、53-73nt)
R2mut-siRNA; 5'-GCCAUAGUGGUCUGCGGAACC-3' (21) (配列番号 28、139-159nt)
R3mut-siRNA; 5'-AGGCCUUGUGGUACUGCCUGAU-3' (22) (配列番号 29、278-299nt)
R5mut-siRNA; 5'-GUCUCGUAGACCGUGCAUCA-3' (20) (配列番号 30、325-344nt)
R6mut-siRNA; 5'-GCGAAAGGCCTTGTGGTACTG-3' (21) (配列番号 31、273-293nt)
R7mut-siRNA; 5'-GTCTCGTAGACCGTGCACCA-3' (20) (配列番号 32、325-344nt)

【0032】

2) 3'-UTR を標的とする siRNA

R8-siRNA; 5'-GGCTCCATCTTAGCCCTAGTC-3' (21) (配列番号 33、9515-9535nt)
R9-siRNA; 5'-GGCTAGCTGTGAAAGGTCCGT-3' (21) (配列番号 34、9538-9558nt)

【0033】

実施例 3 HCV のコアタンパク質の発現に対する効果

本発明者等はこれまでにCre/loxPシステムによりHCV全ゲノムをスイッチング発現する系を確立しており (J. Biol. Chem. 273, 9001-6 (1998))、今回Cre recombinaseによりHCV全ゲノム (Genotype 1b, nucleotide no. 1~9611nt) を持続発現するヒト由来肝細胞株Rz-HepM6を構築し、これを標的とした。Rz-HepM6細胞を10%ウシ胎児血清 (REHATUIN cat. no. 1020-90) を含むDulbecco's Modified EAGLE MEDIUM (NISSUI cat. no. 05915) に懸濁し、24穴プレートに1ウェルあたり 10^5 個の細胞で蒔き、37℃、5%CO₂で一夜培養した。細胞密度が50~70%のときにsiRNAの導入を行なった。すなわち、2.0 μ lのOligofectamineトランスフェクション試薬 (Invitrogen cat. No. 12252-011) と5.5 μ lのOpti-MEM 1 (Gibco cat. No. 22600) を加えよく攪拌し、室温にて10分間放置した。その後、5.0 μ lの合成した10 μ M siRNAをOpti-MEM 1 40 μ lに希釈し、最終200 nMになるように加えた。室温にて20分間放置した後、あらかじめ培養液を200 μ lのOpti-MEM 1に交換した細胞に、Oligofectamine 試薬を加えたsiRNAを直接加え37℃、5%CO₂で培養した。

【0034】

siRNA添加4時間後、3倍濃度にあたる30%のウシ胎児血清を含むDulbecco's Modified EAGLE MEDIUM 125 μ lを加え37℃、5 %CO₂で培養する。血清添加24時間後、細胞をlysis Buffer(1% SDS, 0.5% NP40, 0.15M NaCl, 0.5M EDTA, 1mM DTT, 10mM Tris:pH7.4)20 μ lにて回収し、HCVコア定量キット(国際試薬cat. No. 14861)を用いてHCVコアタンパク質を定量した。

【0035】

図6に、siRNA添加とRz-HepM6細胞株が産生するHCVコアタンパク量との関係を示す。200 μ Mの各siRNA (R1-siRNA、R2-siRNA、R3-siRNA、R5-siRNA、R1mut-siRNA、R2mut-siRNA、R3mut-siRNA、及びR5mut-siRNA) を添加後、ウイルス粒子を構成するコアタンパク質をELISA法で定量した。添加した全てのsiRNAはコアタンパク質の合成を阻害したが、特にR3、R5はその作用が強く、また塩基配列の特異性も高いことが観察された。また、これらの変異導入配列であるR3mutとR5mutはコアタンパク質の発現抑制効果が減弱された。

【0036】

実施例4 レプリコンアッセイ

HCV-RNAのコピー数を定量するためにHCV-RNAの中にレポーター遺伝子としてホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子を導入したものを構築した。Kriegerら (J. Virol. 75, 4614-24 (2001)) の方法に従い、HCV遺伝子のInternal Ribosome Entry Site(IRES)の直下にネオマイシン耐性遺伝子と融合する形でルシフェラーゼ遺伝子を導入した。In vitroで当該RNAを合成後、エレクトロポレーション法でHuh7細胞 (Japanese Collection of Research Bioresources) に導入しG418耐性クローンとして単離した。ホタル・ルシフェラーゼHCVレプリコン細胞 (Huh-3-1) を5 %ウシ胎児血清 (Hyclone cat. no. SH30071.03) を含むダルベッコMEM (Gibco cat. no. 10569) に懸濁し96穴プレートに5000細胞/Wellで蒔き、5 %CO₂, 37℃で一夜培養した。約20時間後、希釈した化合物をWellあたり10 μ l加え、さらに3日間培養した。アッセイプレートは2系統用意し、1つは白色プレート、他はクリアプレートでアッセイを行った。

【0037】

培養終了後、白色プレートはSteady-Glo Luciferase Assay System (Promega

cat. no. E2520) に用いた。すなわち、Wellあたり100 μ lの試薬を入れ、3~4回ピペットで混ぜ、5分間放置後に1450 MicroBeta TRILUX (WALLAC) にてルミネッセンスを測定した。

【0038】

合成したsiRNAは以下の方法でHCVレプリコン細胞に導入した。すなわち、96穴プレートに細胞を、1ウェルあたり10000個蒔き、37℃、5%CO₂で一夜培養した。細胞密度が50~70%のときにsiRNAの導入を行なった。すなわち、1.5 μ lのTransIT-TKOトランスフェクション試薬 (Mirus Corporation cat. No. MIR2150) と25 μ lのOpti-MEM1 (cata no. 31985) を激しく攪拌後、20分間静置し、0.125~1.25 μ lのsiRNAを混ぜ、緩やかに攪拌後さらに20分間静置した。この溶液を96穴プレート中の100 μ lの細胞に静かに加え、緩やかに攪拌後37℃、5%CO₂で一夜培養した。この細胞を用いてレプリコンアッセイを行なった。siRNAを終濃度1nM, 10nM, 30nM, 100nMになるように加え、TransIT-TKOトランスフェクション試薬にて導入後24時間後にHCVレプリコン活性をレポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ活性) を指標に測定した。細胞未添加の値をバックグラウンドとして全ての値から差し引き、siRNA未添加の活性を100%として、各siRNAの活性を算出した。

【0039】

図7にsiRNA添加とHCVレプリコンが複製する活性との関係を示す。配列R3, R5, R6, R7は容量依存的にレプリコンの活性を阻害した。また、これらの塩基配列の一部置換体である配列R3mut, R5mut, R6mut, R7mutはその効果が減弱されたため、配列R3, R5, R6, R7は塩基配列特異的な抗ウイルス作用を示すと考えられる。

【0040】

実施例5 RNAトランスフェクション効率の算定

Silencer siRNA Labeling Kit (Ambion cat no.1632) を用いてプロトコールに従ってCy3でsiRNAを標識した。すなわち、R7-siRNA 10 μ M (19.2 μ l)に7.5 μ lのCy3ラベリング試薬を加え、50 μ l中で37℃、1時間遮光した状態で標識を行なった。5 μ lの5M NaClと2.5倍量の99.5%エタノールを加えて-20℃でエタノー

ル沈殿を行なった。4℃、15000回転/分の遠心でCy3標識のsiRNAを回収した。
標識されたsiRNAの定量はCy3の吸収極大と分子吸光係数から算定した(http://www.ambion.com/techlib/append/base_dye.html)。

【0041】

得られたCy3標識siRNAをTransIT-TKOトランスフェクション試薬を用いて細胞に導入し、24時間後に蛍光顕微鏡にて観察した。初めに位相差顕微鏡の視野で細胞の位置を確認した後、蛍光顕微鏡でCy3染色された細胞を観察した。このとき用いた波長は励起波長510nm、吸収波長 550nmであった。Cy3で標識された細胞は全体の約90%であり、非常に高いトランスフェクション効率であることが明らかとなった。

【0042】

【発明の効果】

以上詳述したように、本発明によって、HCVのRNAに対して配列特異的に結合し、HCVの働きを阻害するオリゴリボヌクレオチドまたはペプチド核酸、及びこれらを有効成分とするC型肝炎治療剤が提供され、HCVの新規かつ確実な治療法の提供が可能となった。

【0043】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI PHARMACEUTICAL CO., LTD

TOKYO METROPOLITAN ORGANIZATION FOR MEDICAL RESEARCH

<120> An Oligoribonucleotide and an Peptide Nucleic Inhibiting the Action of Hepatitis C Virus

<130> P03-0030

<160> 34

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 500

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 1

```
gccagccccc tgatgggggc gacactccac catgaatcac tcccctgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtggctct cggaaccggt gagtacaccg gaattgccag 180
gacgaccggg tcctttcttg gatcaaccgc ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
gcaagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtggtact gcctgatagg 300
gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcacg aatcctaaac 360
ctcaaaaaaa aaacaaacgt aacaccaacc gtcgccca gacgtcaag ttcccgggtg 420
gcggtcagat cgttgggtga gtttacttgt tgccgcgcag gggccctaga ttgggtgtgc 480
gcgcgacgag aaagacttcc 500
```

<210> 2

<211> 500

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 2

```
cgattggggg cgacactcca ccatagatca ctcccctgtg aggaactact gtcttcacgc 60
agaaagcgtc tagccatggc gttagtatga gtgtcgtgca gcctccagga cccccctcc 120
cgggagagcc atagtgtct gcggaaccgg tgagtacacc ggaattgccg ggacgaccgg 180
gtcctttctt ggatcaaccc gctcaatgcc tggagatttg ggcgtgcccc cgcgagactg 240
```

ctagccgagt agtggtgggt cgcgaaaggc cttgtgttac tgcctgatag ggtgcttgcg 300
agtgccccgg gaggtctcgt agaccgtgca ccatgagcac gaatcctaaa cctcaaagaa 360
aaaccaaacg taacaccaac cgccgcccac aggacgtcaa gttcccgggc ggtggtcaga 420
tcgttggtgg agtttacctg ttgccgcgca ggggccccag gttgggtgtg cgcgcgcca 480
ggaagacttc cgagcggtcg 500

<210> 3

<211> 500

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 3

ttgggggcga cactccacca tagatcactc ccctgtgagg aactactgtc ttcacgcaga 60
aagcgtctag ccatggcggt agtatgagtg ttgtgcagcc tccaggaccc cccctcccgg 120
gagagccata gtggtctgcg gaaccggtga gtacaccgga attgccagga cgaccgggtc 180
ctttcttggg tcaaccgcgt caatgcctgg agatttgggc gtgccccgc gagactgcta 240
gccgagtagt gttgggtcgc gaaaggcctt gtggtactgc ctgatagggt gcttgcgagt 300
gccccgggag gtctcgtaga ccgtgcatca tgagcacaaa tcctaaacct caaagaaaaa 360
ccaaacgtaa caccaaccgc cgcccacagg acgttaagtt cccgggcggg ggtcagatcg 420
ttggtggagt ttacctgttg ccgcgcaggg gcccaggtt ggggtgtgcgc gcgactagga 480
agacttccga gcggtcgcaa 500

<210> 4

<211> 500

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 4

gggccagccc ccgattgggg gcgacactcc accatagatc actcccctgt gaggaactac 60

tgtcttcacg cagaaagcgt ctagccatgg cgttagtatg agtgtcgtgc agcctccagg 120
acccccctc ccgggagagc catagtggtc tgcggaaccg gtgagtacac cggaattgcc 180
aggacgaccg ggtcctttct tggatcaacc cgctcaatgc ctggagattt gggcgtgccc 240
ccgcgagact gctagccgag tagtgttggg tcgcgaaagg ccttgtggta ctgcctgata 300
gggtgcttgc gagtgccccg ggaggctctg tagaccgtgc atcatgagca caaatcccaa 360
accccaaaga aaaaccaaac gtaacaccaa ccgtcgccca caggacgtca agttcccggg 420
tggtggtcag atcgttgggt gagtttacct gttgccgcgc aggggccccca ggttgggtgt 480
gcgcgcgact aggaagactt 500

<210> 5

<211> 500

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 5

acccgcccc taataggggc gacactccgc catgaatcac tcccctgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtacag cctccaggcc 120
ccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaccggt gagtacaccg gaattgccgg 180
gaagaccggg tcctttcttg gataaaccgc ctctatgccc ggccatttgg gcgtgcccc 240
gcaagactgc tagccgagta gcgttgggtt gcgaaaggcc ttgtggtact gcctgatagg 300
gtgcttgca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcaca aatcctaaac 360
ctcaaagaaa aacccaaaga aacactaacc gtcgcccaca agacgttaag tttccgggcg 420
gcggccagat cgttggcgga gtatacttgt tgccgcgtag gggccccaga ttgggtgtgc 480
gcacagcaag gaagacttcg 500

<210> 6

<211> 500

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 6

acccgcccc taataggggc gacactccgc catgaatcac tcccctgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtacag cctccaggcc 120
ccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaccggt gagtacaccg gaattgccgg 180
gaagactggg tcctttcttg gataaacca ctctatgccc ggccatttgg gcgtgcccc 240
gcaagactgc tagccgagta gcgttgggtt gcgaaaggcc ttgtggtact gcctgatagg 300
gtgcttgcga gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcaca aatcctaaac 360
ctcaaagaaa aaccacaga aacactaacc gtcgcccaca agacgttaag tttccgggcg 420
gcggccagat cgttggcgga gtatacttgt tgccgcgcag gggccctaga ttgggtgtgc 480
gcacgacaag gaagacttcg 500

<210> 7

<211> 500

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 7

acccgcccct aataggggcg acactccgcc atgaaccact ccctgtgag gaactactgt 60
cttcacgcag aaagcgtcta gccatggcgt tagtatgagt gtcgtacagc ctccaggccc 120
ccccctccc ggagagccat agtggtctgc ggaaccggtg agtacaccgg aattgccggg 180
aagactgggt cttttcttgg ataaaccac tctatgcccg gtcatttggg cgtgcccccg 240
caagactgct agccgagtag cgttgggttg cgaaaggcct tgtggtactg cctgataggg 300
tgcttgcgag tgccccggga ggtctcgtag accgtgcacc atgagcaca atcctaaacc 360
tcaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg tcgcccacaa gacgttaagt ttccgggagg 420
cggccagatc gttggcgag tatacttgtt gccgcgcagg ggccccagggt tgggtgtgcg 480
cgcgacaagg aagacttcgg 500

<210> 8

<211> 500

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 8

```
acctgccct aatagggcg acactccgcc atgaatcact cccctgtgag gaactactgt 60
cttcacgcag aaagcgccta gccatggcgt tagtatgagt gtcgtacagc ctccaggccc 120
ccccctcccg ggagagccat agtgggtctgc ggaaccggtg agtacaccgg aattgccggg 180
aagactgggt cttttcttgg ataaaccac tctatgcccg gccatttggg cgtgcccccg 240
caagactgct agccgagtag cgttgggttg cgaaaggcct tgttgtactg cctgataggg 300
cgcttgcgag tgccccggga ggtctcgtag accgtgcacc atgagcaca atcctaaacc 360
tcaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg tcgcccagaa gacgttaagt tcccgggcgg 420
cggccagatc gttggcggag tatacttgtt gccgcgcagg ggccccaggt tgggtgtgcg 480
cacgacaagg aaaacttcgg                                     500
```

<210> 9

<211> 500

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 9

```
acccgcccc taataggggc gacactccgc catgaatcac tcccctgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgcgtacag cctccaggcc 120
ccccctccc gggagagcca tagtgggtctg cggaaccggt gagtacaccg gaattgccgg 180
gaagactggg tcctttcttg gataaaccca ctctatgcc ggccatttgg gcgtgcccc 240
gcaagactgc tagccgagta gcgttgggtt gcgaaaggcc ttgttgtact gcctgatagg 300
gtgcttgcga gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcaca aatcctaaac 360
ctcaaagaaa aaccacaga aacactaacc gtcgcccaca agacgttaag tttccgggcg 420
gcggccagat cgittggcga gtatacttgt tgccgcgcag gggccctaga ttgggtgtgc 480
```

gcacgacaag gaagacttcg

500

<210> 10

<211> 500

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 10

accgcgccct aataggggcg acactccgcc atgaatcact cccctgtgag gaactactgt 60
cttcacgcag aaagcgtcta gccatggcgt tagtatgagt gtcgtacagc ctccaggccc 120
ccccctcccg ggagagccat agtgggtctgc ggaaccggtg agtacaccgg aattgccggg 180
aagactgggt cttttcttgg ataaaccac tctatgcccg gccatttggg cgtgcccccg 240
caagaccgct agccgagtag cgttgggttg cgaaaggcct tgttgtactg cctgataggg 300
tgcttgcgag tgccccggga ggtctcgtag accgtgcacc atgagcaca atcctaaacc 360
tcaaagacaa accaaaagaa acaccagccg tcgcccacaa gacgttaggt ttccgggcgg 420
cggccagatc gttggcggag tatacttggt gccgcgcagg ggccccaggt tgggtgtgcg 480
cgcgacaagg aagacttcgg 500

<210> 11

<211> 500

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 11

gcccccccc tgatgggggc gacactccgc catgaatcac tcccctgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgcgtacag cctccaggcc 120
ccccctccc gggagagcca tagtgggtctg cggaaccggt gagtacaccg gaattaccgg 180
aaagactggg tcctttcttg gataaaccca ctctatgtcc ggtcatttgg gcacgcccc 240
gcaagactgc tagccgagta gcgttgggtt gcgaaaggcc ttgttgtact gcctgatagg 300

gtgcttgca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcat catgagcaca aatcctaaac 360
ctcaaagaaa aaccaaaga aacacaaacc gccgcccaca ggacgttaag ttcccgggtg 420
gcggtcagat cgttggcgga gtttacttgc tgccgcgcag gggccccagg ttgggtgtgc 480
gcgcgacaag gaagacttct 500

<210> 12

<211> 311

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 12

gcgtgtctca tgcccggccc cgctggttct ggttttgcct actcctgctc gctgcagggg 60
taggcatcta cctcctcccc aaccgatgaa ggttggggta aacactccgg cctcttaagc 120
catttctgt tttttttttt tttttttttt tttttttctt ttttttttc tttcctttcc 180
ttcttttttt cttttctttt tcccttcttt aatgggtggct ccatcttagc cctagtcacg 240
gctagctgtg aaaggctcgt gagccgcatg actgcagaga gtgctgatac tggcctctct 300
gcagatcatg t 311

<210> 13

<211> 371

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 13

gtccagctgg ttcgtggctg gttacagcgg gggagacata tatcacagcc tgtctcgtgc 60
ccgaccccg c tggttcatgt tgtgcctact cctactttca gtaggggtag gcatctacct 120
gctccccaac cgataaacgg ggagctaaac actccaggcc aataggccat ttcttttttt 180
tttttttttt ttttttcttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 240
ctttcttttg tttttttttt ttttcttctt ttgggtggct ccatcttagc cctagtcacg 300

gctagctgtg aaaggtccgt gagccgcatg actgcagaga gtgctgatac tggcctctct 360
gcagatcatg t 371

<210> 14

<211> 439

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 14

tgggcggtga agaccaagct caaactcact ccattgccgg aagcgcgcct cctggattta 60
tccagctggg tcaactgtcgg cgccggcgagg ggcgacattt atcacagcgt gccgcgtgcc 120
cgaccccgtt tattactcct tggcctactc ctactttttg taggggtagg ccttttccta 180
ctccccgctc ggtagagcgg cacacattag ctacactcca tagctaactg tccctttttt 240
tttgtttttt tttttttttt tttttttttt ttttcttttt tttttttttt tttgtttctt 300
ttcctttctc tttccttctt atcttaatta cttcctttcc tgggtggctcc atcttagccc 360
tagtcacggc tagctgtgaa aggtccgtga gccgcatgac tgcagagatt gccgtaactg 420
gtatctctgc agatcatgt 439

<210> 15

<211> 347

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 15

cctggattta tccagctggg tcaactgtcgg cgccggcgagg ggcgacattt atcacagcgt 60
gccgcgtgcc cgaccccgtt tattactcct tggcctactc ctactttttg taggggtagg 120
ccttttccta ctccccgctc ggtagagcgg cacacattag ctacactcca tagctaactg 180
tccctttttt tttttttttt tgtttctttt ctttctcatt tccttcttat cttaattact 240
ttctttcctg gtggctccat cttagcccta gtcacggcta gctgtgaaag gtccgtgagc 300

cgcatgactg cagagattgc cgtaactggt atctctgcag atcatgt

347

<210> 16

<211> 360

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 16

tttatccagt tggtttaccg tcggcgccgg cggggggcgac atttatcaca gcgtgtcgcg 60
tgcccgaccc cgcttattac tccttagcct actcctactt ttcgtagggg taggcctctt 120
tttactcccc gctcggtaga gcggcacaca ttagctacac tccatagcta actgttcctt 180
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 240
ttttttttct ttccttcctt tctcaccttc ttttacttct ttcctgggtgg ctccatctta 300
gccctagtca cggctagctg tgaaaggtcc gtgagccgca tgactgcaga gagtgccgta 360

<210> 17

<211> 378

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 17

ggacttatcc agttggttca ccgtcggcgc cggcggggggc gacatttttc acagcgtgtc 60
gcgcgccccga ccccgctcat tactcttcgg cctactccta cttttcgtag gggtaggcct 120
cttcctactc cccgctcggg agagcggcac aactaggta cactccatag ctaactgttc 180
cttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt ttttcttttt tttttttttc 240
cctctttctt cccttctcat cttattctac tttctttctt ggtgggtcca tcttagccct 300
agtcacggct agctgtgaaa ggtccgtgag ccgcatgact gcagagagtg ccgtaactgg 360
tctctctgca gatcatgt

378

<210> 18

<211> 374

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 18

```
ggatttgtcc agttggttta ccgtcggcgc cggcgggggc gacatttata acagcgtgtc 60
gcgtgcccga ccccgccctat tactccttag cctactccta ctttctgtag gggtaggcct 120
cttcctactc cccgctcgat agagcggcac acattagcta cactccatag ctaactgttc 180
cttttttttt tttttttttt tttttttttt ttttttttcc tttttttttt tttttccctc 240
tttcttcctt tctcatctta ttctactttc tttcttggtg gctccatctt agccctggtc 300
acggctagct gtgaaaggtc cgtgagccgc atgactgcag agagtgccgt aactggtctc 360
tctgcagatc atgt 374
```

<210> 19

<211> 354

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 19

```
tagatttata cgggtggttc accgtgggcg ccggcggggg cgacatcttt cacagcgtgt 60
cgcatgcccg accccgccta ttactccttt gcctactcct acttagcgta ggagtaggca 120
tctttttact ccccgctcgg tagagcggca aaccctagct acactccata gctagttttc 180
tttttttttt tttttttttt ttttgttttt ttttttttcc ctctttttcc gtattttttt 240
tttttcctct tttcttggtg gctccatctt agccctagtc acggctagct gtgaaaggtc 300
cgtgagccgc atgactgcag agagtgccgt aactggtctc tctgcagatc atgt 354
```

<210> 20

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5'-UTR target siRNA

<400> 20

ggaacuacug ucuucacgca g

21

<210> 21

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5'-UTR target siRNA

<400> 21

gccauagugg ucugcggaac c

21

<210> 22

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5'-UTR target siRNA

<400> 22

aggccuugug guacugccug au

22

<210> 23

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5'-UTR target siRNA

<400> 23

gucucguaga ccgugcauca

20

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5'-UTR target siRNA

<400> 24

gcgaaaggcc ttgtggtact g

21

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5'-UTR target siRNA

<400> 25

gtctcgtaga ccgtgcacca

20

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5'-UTR target siRNA

<400> 26

gucucguaga ccgugcauca t

21

<210> 27

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5'-UTR target siRNA

<400> 27

ggaacuacug ucuucacgca g

21

<210> 28

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5'-UTR target siRNA

<400> 28

gccauagugg ucugcggaac c

21

<210> 29

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5'-UTR target siRNA

<400> 29

aggccuugug guacugccug au

22

<210> 30

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5'-UTR target siRNA

<400> 30

gucucguaga ccgugcauca

20

<210> 31

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5'-UTR target siRNA

<400> 31

gcgaaaggcc ttgtggtact g

21

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5'-UTR target siRNA

<400> 32

gtctcgtaga ccgtgcacca

20

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3'-UTR target siRNA

<400> 33

ggctccatct tagccctagt c

21

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3'-UTR target siRNA

<400> 34

ggctagctgt gaaaggtccg t

21

【0044】

【配列表フリーテキスト】

配列番号 20～32 : 5'-UTR ターゲット siRNA

配列番号 33 及び 34 : 3'-UTR ターゲット siRNA

【図面の簡単な説明】

【図 1】

HCV RNAの5' UTRにおける一般的な二次構造を示す。

【図 2】

HCV RNAの3' UTRにおける一般的な二次構造を示す。

【図 3 (A)】

HCVの分離株HCV-1、HCV-BK、HCV-JのRNAの5'側の非翻訳領域からコア領域の50

0塩基についてのcDNA配列を示す。

【図3 (B)】

HCVの分離株R6、R24、S14JのRNAの5'側の非翻訳領域からコア領域の500塩基についてのcDNA配列を示す。

【図3 (C)】

HCVの分離株HCJ6、JFH1、JCH1のRNAの5'側の非翻訳領域からコア領域の500塩基についてのcDNA配列を示す。

【図3 (D)】

HCVの分離株JCH3及びHCJ8のRNAの5'側の非翻訳領域からコア領域の500塩基についてのcDNA配列を示す。

【図4 (A)】

各種HCV 5'非翻訳領域のマルチプルアライメントの結果(前半)を示す。

【図4 (B)】

各種HCV 5'非翻訳領域のマルチプルアライメントの結果(後半)を示す。

【図5 (A)】

pH77J6S、R6、R24L、R24SのRNAの3'側の非翻訳領域についてのcDNA配列を示す。

【図5 (B)】

HCJ6CH、JFH1、JCH1、2b_AB030907のRNAの3'側の非翻訳領域についてのcDNA配列を示す。

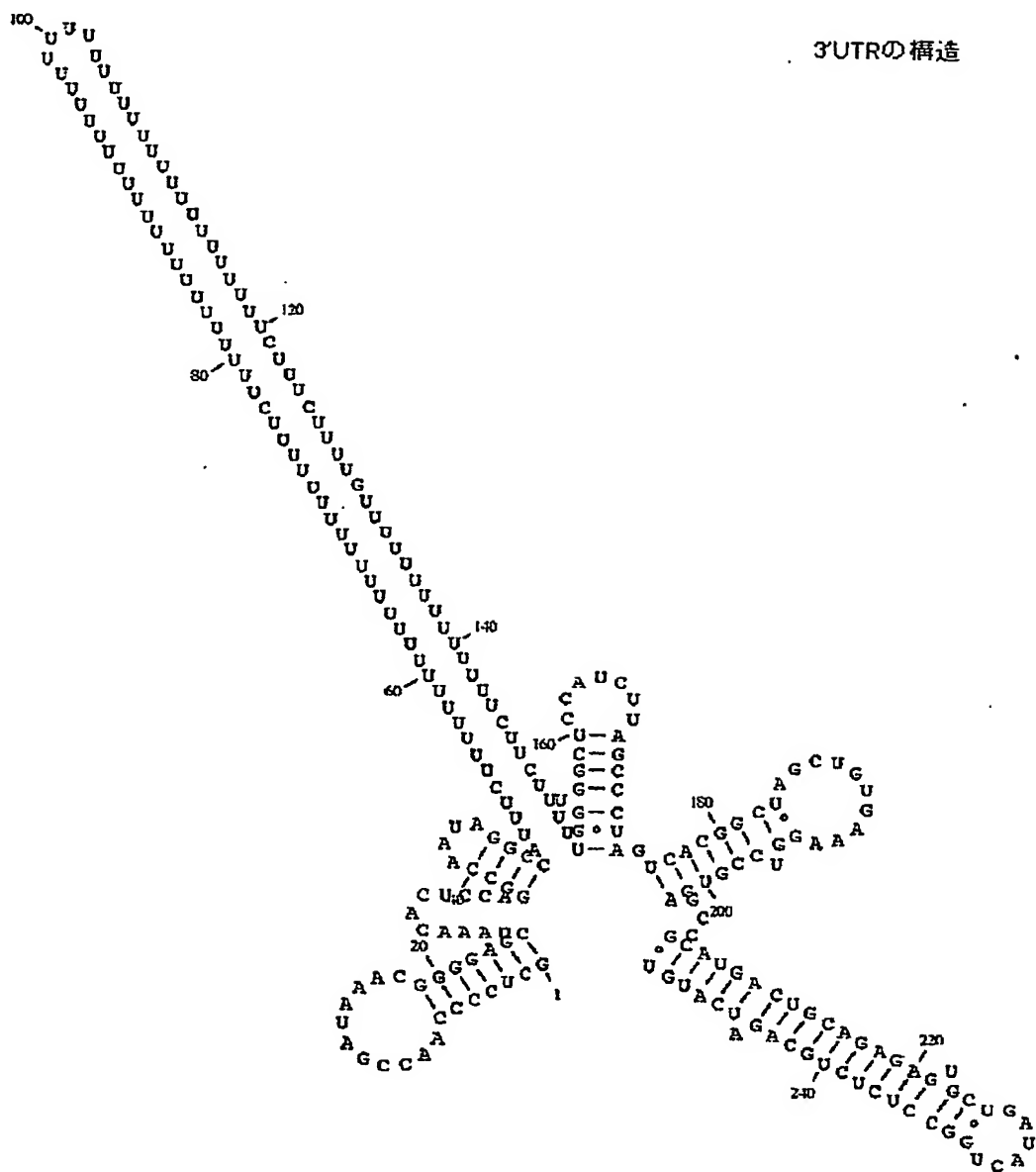
【図6】

siRNA添加とRz-HepM6細胞株が産生するHCVコアタンパク量との関係を示す。

【図7】

siRNA添加とHCVレプリコンが複製する活性との関係を示す。

【図2】



【図 3 (A)】

(A)

HCV-1

GCCAGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCA
GAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCA
TAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGATCAACCCG
CTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTTGGGTGCGGAAAGGCC
TTGTGTTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGACCATGAGCAG
AATCCTAAACCTCAAAAAAAAAAACGTAACACCAACCGTCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGGTG
GCGGTGAGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTGCGCGCAGGGGCCCTAGATTGGGTGTGCGCGCAGCAG
AAAGACTTCC (配列番号 1)

HCV-BK

CGATTGGGGGCGACACTCCACCATAGATCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTC
TAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCT
GCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGATCAACCCGCTCAATGCC
TGGAGATTTGGGCGTGCCCCGCGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTTGGGTGCGGAAAGGCCTTGTGGTAC
TGCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGACCATGAGCACGAATCCTAAA
CCTCAAAGAAAAACCAACGTAACACCAACCGCCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGGCGGTGGTCAGA
TCGTTGGTGAGTTTACCTGTTGCCGCGCAGGGGCCCCAGGTTGGGTGTGCGCGCGCCAGGAAGACTTC
CGAGCGGTG (配列番号 2)

HCV-J

TTGGGGGCGACACTCCACCATAGATCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAG
CCATGGCGTTAGTATGAGTGTTGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCG
GAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGATCAACCCGCTCAATGCCTGG
AGATTTGGGCGTGCCCCGCGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTTGGGTGCGGAAAGGCCTTGTGGTACTGC
CTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGATCATGAGCACAAATCCTAAACCT
CAAAGAAAAACCAACGTAACACCAACCGCCGCCACAGGACGTAAAGTTCCCGGGCGGTGGTCAGATCG
TTGGTGGAGTTTACCTGTTGCCGCGCAGGGGCCCCAGGTTGGGTGTGCGCGCGACTAGGAAGACTTCCGA
GCGGTGCGAA (配列番号 3)

【図 3 (B)】

(B)

R6

GGGCCAGCCCCGATTGGGGGCGACACTCCACCATAGATCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACG
CAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGC
CATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGATCAACC
CGCTCAATGCCTGGAGATTGGGCGTGCCCCGCGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTTGGGTCGCGAAAGG
CCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGATCATGAGCA
CAAATCCCAAACCCAAAGAAAAACCAAACGTAACACCAACCGTCGCCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGG
TGGTGGTCAGATCGTTGGTGGAGTTACCTGTTGCCGCGCAGGGGCCCCAGGTTGGGTGTGCGCGCGACT
AGGAAGACTT (配列番号 4)

R24

ACCCGCCCCCTAATAGGGGCGACACTCCGCCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCA
GAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTACAGCCTCCAGGCCCCCCCCCTCCCGGGAGAGCCA
TAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCGGGAAGACCGGGTCCTTTCTTGATAAACCCG
CTCTATGCCCGGCCATTTGGGCGTGCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGCGTTGGGTTGCGAAAGGCC
TTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGACCATGAGCACA
AATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCCAAAGAAACACTAACCGTCGCCCACAAGACGTTAAGTTTCCGGGCG
GCGGCCAGATCGTTGGCGGAGTATACTTGTGCGCGTAGGGGCCCCAGATTGGGTGTGCGCACAGCAAG
GAAGACTTCG (配列番号 5)

S14J

ACCCGCCCCCTAATAGGGGCGACACTCCGCCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCA
GAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTACAGCCTCCAGGCCCCCCCCCTCCCGGGAGAGCCA
TAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCGGGAAGACTGGGTCCTTTCTTGATAAACCCA
CTCTATGCCCGGCCATTTGGGCGTGCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGCGTTGGGTTGCGAAAGGCC
TTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGACCATGAGCACA
AATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCCACAGAAACACTAACCGTCGCCCACAAGACGTTAAGTTTCCGGGCG
GCGGCCAGATCGTTGGCGGAGTATACTTGTGCGCGCAGGGGCCCTAGATTGGGTGTGCGCACAGCAAG
GAAGACTTCG (配列番号 6)

【図 3 (C)】

(C)

HCJ6

ACCCGCCCCCTAATAGGGGCGACACTCCGCCATGAACCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCAG
AAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGACAGCCTCCAGGCCCCCCCCCTCCCGGGAGAGCCAT
AGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCGGGAAGACTGGGTCTTTCTTGATATAACCCAC
TCTATGCCCCGGTCATTTGGGCGTGCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGCGTTGGGTTGCGAAAGGCCT
TGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGACCATGAGCACAA
ATCCTAAACCTCAAAGAAAAACAAAAGAAACACCAACCGTCGCCCACAAGACGTTAAGTTCCGGGCGG
CGGCCAGATCGTTGGCGGAGTATACTTGTGGCCGCGCAGGGGCCCCAGGTTGGGTGTGCGCGGACAAGG
AAGACTTCGG (配列番号 7)

JFH1

ACCTGCCCCCTAATAGGGGCGACACTCCGCCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCAG
AAAGCGCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGACAGCCTCCAGGCCCCCCCCCTCCCGGGAGAGCCAT
AGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCGGGAAGACTGGGTCTTTCTTGATATAACCCAC
TCTATGCCCCGGCCATTTGGGCGTGCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGCGTTGGGTTGCGAAAGGCCT
TGTGGTACTGCCTGATAGGGCGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGACCATGAGCACAA
ATCCTAAACCTCAAAGAAAAACAAAAGAAACACCAACCGTCGCCCAGAAGACGTTAAGTTCCGGGCGG
CGGCCAGATCGTTGGCGGAGTATACTTGTGGCCGCGCAGGGGCCCCAGGTTGGGTGTGCGCACGACAAGG
AAAACCTTCGG (配列番号 8)

JCH1

ACCCGCCCCCTAATAGGGGCGACACTCCGCCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCA
GAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGACAGCCTCCAGGCCCCCCCCCTCCCGGGAGAGCCA
TAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCGGGAAGACTGGGTCTTTCTTGATATAACCCA
CTCTATGCCCCGGCCATTTGGGCGTGCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGCGTTGGGTTGCGAAAGGCC
TTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGACCATGAGCACAA
AATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCCACAGAAACACTAACCGTCGCCCACAAGACGTTAAGTTCCGGGCGG
GCGGCCAGATCGTTGGCGGAGTATACTTGTGGCCGCGCAGGGGCCCTAGATTGGGTGTGCGCACGACAAG
GAAGACTTCG (配列番号 9)

【図 3 (D)】

(D)

JCH3

ACCCGCCCCTAATAGGGGCGACACTCCGCCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCAG
AAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGACAGCCTCCAGGCCCCCCCCCTCCCGGGAGAGCCAT
AGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCGGGAAGACTGGGTCTTTCTTGGATAAAACCCAC
TCTATGCCCCGCCATTTGGGCGTGCCCCGCAAGACGCTAGCCGAGTAGCGTTGGGTGCGAAAGGCCT
TGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGACCATGAGCACAA
ATCCTAAACCTCAAAGACAAACAAAAAGAAACACCAGCCGTCGCCCACAAGACGTTAGGTTTCCGGGCGG
CGGCCAGATCGTTGGCGGAGTATACTTGTTGCCGCGCAGGGGCCCCAGGTTGGGTGTGCGCGCGACAAGG
AAGACTTCGG (配列番号 10)

HCJ8

GCCCGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCGCCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCA
GAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGACAGCCTCCAGGCCCCCCCCCTCCCGGGAGAGCCA
TAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTACCGGAAAGACTGGGTCTTTCTTGGATAAAACCCA
CTCTATGTCCGGTCATTTGGGCACGCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGCGTTGGGTGCGAAAGGCC
TTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGATCATGAGCACA
AATCCTAAACCTCAAAGAAAAACAAAAAGAAACACAACCGCCGCCACAGGACGTTAAGTTCCCGGGTG
GCGGTCAGATCGTTGGCGGAGTTTACTTGCTGCCGCGCAGGGGCCCCAGGTTGGGTGTGCCGCGACAAG
GAAGACTTCT (配列番号 11)

【図4 (A)】

(A)

| | | | |
|-----------|-----|---|-----|
| Hcv-1.nc | 1 | --GCCAGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCACCATGAATCACTCCCTCTGAGGAACACTAC | 58 |
| Hcv-bk.nc | 1 | -----CGATTGGGGGCGACACTCCACCATAGATCACTCCCTCTGAGGAACACTAC | 49 |
| Hcv-j.nc | 1 | -----TTGGGGGCGACACTCCACCATAGATCACTCCCTCTGAGGAACACTAC | 46 |
| R6.nc | 1 | GGGCCAGCCCCGATGGGGGCGACACTCCACCATAGATCACTCCCTCTGAGGAACACTAC | 60 |
| R24.nc | 1 | --ACCCGCCCTTAATAGGGGCGACACTCCGCCATGAATCACTCCCTCTGAGGAACACTAC | 58 |
| S14j.nc | 1 | --ACCCGCCCTTAATAGGGGCGACACTCCGCCATGAATCACTCCCTCTGAGGAACACTAC | 58 |
| HcJ6.nc | 1 | ACCCGCCCTTAATAGGGGCGACACTCCGCCATGAATCACTCCCTCTGAGGAACACTAC | 60 |
| Jfh1.nc | 1 | --ACCTGCCCTTA-ATAGGGGCGACACTCCGCCATGAATCACTCCCTCTGAGGAACACTAC | 57 |
| Jch1.nc | 1 | --ACCCGCCCTTA-ATAGGGGCGACACTCCGCCATGAATCACTCCCTCTGAGGAACACTAC | 57 |
| Jch3.nc | 1 | --ACCCGCCCTTA-ATAGGGGCGACACTCCGCCATGAATCACTCCCTCTGAGGAACACTAC | 57 |
| HcJ8.nc | 1 | --GCCCGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCGCCATGAATCACTCCCTCTGAGGAACACTAC | 58 |
| Hcv-1.nc | 59 | TGTCTTCACGAGAAAGCGCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGTCAGCCTCCAGG | 118 |
| Hcv-bk.nc | 50 | TGTCTTCACGAGAAAGCGCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGTCAGCCTCCAGG | 109 |
| Hcv-j.nc | 47 | TGTCTTCACGAGAAAGCGCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGTCAGCCTCCAGG | 106 |
| R6.nc | 61 | TGTCTTCACGAGAAAGCGCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGTCAGCCTCCAGG | 120 |
| R24.nc | 59 | TGTCTTCACGAGAAAGCGCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGTCAGCCTCCAGG | 118 |
| S14j.nc | 59 | TGTCTTCACGAGAAAGCGCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGTCAGCCTCCAGG | 118 |
| HcJ6.nc | 61 | CTTCACGAGAAAGCGCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGTCAGCCTCCAGG | 120 |
| Jfh1.nc | 58 | TGTCTTCACGAGAAAGCGCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGTCAGCCTCCAGG | 117 |
| Jch1.nc | 58 | TGTCTTCACGAGAAAGCGCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGTCAGCCTCCAGG | 117 |
| Jch3.nc | 58 | TGTCTTCACGAGAAAGCGCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGTCAGCCTCCAGG | 117 |
| HcJ8.nc | 59 | TGTCTTCACGAGAAAGCGCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGTCAGCCTCCAGG | 118 |
| Hcv-1.nc | 119 | ACCCGCCCTCCCGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCC | 178 |
| Hcv-bk.nc | 110 | ACCCGCCCTCCCGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCC | 169 |
| Hcv-j.nc | 107 | ACCCGCCCTCCCGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCC | 166 |
| R6.nc | 121 | ACCCGCCCTCCCGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCC | 180 |
| R24.nc | 119 | CCCCCCCCCTCCCGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCC | 178 |
| S14j.nc | 119 | CCCCCCCCCTCCCGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCC | 178 |
| HcJ6.nc | 121 | CCCCCTCCCGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCC | 180 |
| Jfh1.nc | 118 | CCCCCCCCCTCCCGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCC | 177 |
| Jch1.nc | 118 | CCCCCCCCCTCCCGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCC | 177 |
| Jch3.nc | 118 | CCCCCCCCCTCCCGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCC | 177 |
| HcJ8.nc | 119 | CCCCCCCCCTCCCGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCC | 178 |
| Hcv-1.nc | 179 | AGGAGGACCGGGTCTTTCTTGGATCAACCCGCTCATGCGTGGAGATTGGGGCTGCCG | 238 |
| Hcv-bk.nc | 170 | AGGAGGACCGGGTCTTTCTTGGATCAACCCGCTCATGCGTGGAGATTGGGGCTGCCG | 229 |
| Hcv-j.nc | 167 | AGGAGGACCGGGTCTTTCTTGGATCAACCCGCTCATGCGTGGAGATTGGGGCTGCCG | 226 |
| R6.nc | 181 | AGGAGGACCGGGTCTTTCTTGGATCAACCCGCTCATGCGTGGAGATTGGGGCTGCCG | 240 |
| R24.nc | 179 | GGGAGGACCGGGTCTTTCTTGGATCAACCCGCTCATGCGTGGAGATTGGGGCTGCCG | 238 |
| S14j.nc | 179 | GGGAGGACCGGGTCTTTCTTGGATCAACCCGCTCATGCGTGGAGATTGGGGCTGCCG | 238 |
| HcJ6.nc | 181 | AGGAGGACCGGGTCTTTCTTGGATCAACCCGCTCATGCGTGGAGATTGGGGCTGCCG | 240 |
| Jfh1.nc | 178 | GGGAGGACCGGGTCTTTCTTGGATCAACCCGCTCATGCGTGGAGATTGGGGCTGCCG | 237 |
| Jch1.nc | 178 | GGGAGGACCGGGTCTTTCTTGGATCAACCCGCTCATGCGTGGAGATTGGGGCTGCCG | 237 |
| Jch3.nc | 178 | GGGAGGACCGGGTCTTTCTTGGATCAACCCGCTCATGCGTGGAGATTGGGGCTGCCG | 237 |
| HcJ8.nc | 179 | GGGAGGACCGGGTCTTTCTTGGATCAACCCGCTCATGCGTGGAGATTGGGGCTGCCG | 238 |
| Hcv-1.nc | 239 | CCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTTCGGAAGGCCCTGTGGTACTGCCGTGATA | 298 |
| Hcv-bk.nc | 230 | CCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTTCGGAAGGCCCTGTGGTACTGCCGTGATA | 289 |
| Hcv-j.nc | 227 | CCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTTCGGAAGGCCCTGTGGTACTGCCGTGATA | 286 |
| R6.nc | 241 | CCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTTCGGAAGGCCCTGTGGTACTGCCGTGATA | 300 |
| R24.nc | 239 | CCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTTCGGAAGGCCCTGTGGTACTGCCGTGATA | 298 |
| S14j.nc | 239 | CCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTTCGGAAGGCCCTGTGGTACTGCCGTGATA | 298 |
| HcJ6.nc | 241 | CAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTTCGGAAGGCCCTGTGGTACTGCCGTGATA | 300 |
| Jfh1.nc | 238 | CCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTTCGGAAGGCCCTGTGGTACTGCCGTGATA | 297 |
| Jch1.nc | 238 | CCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTTCGGAAGGCCCTGTGGTACTGCCGTGATA | 297 |
| Jch3.nc | 238 | CCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTTCGGAAGGCCCTGTGGTACTGCCGTGATA | 297 |
| HcJ8.nc | 239 | CCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTTCGGAAGGCCCTGTGGTACTGCCGTGATA | 298 |
| Hcv-1.nc | 299 | GGGTGCTTGCAGTGCCTCCGGAGGCTCTCGTAGACCGTGCAACCATGAGCACAATCCCTAA | 358 |
| Hcv-bk.nc | 290 | GGGTGCTTGCAGTGCCTCCGGAGGCTCTCGTAGACCGTGCAACCATGAGCACAATCCCTAA | 349 |
| Hcv-j.nc | 287 | GGGTGCTTGCAGTGCCTCCGGAGGCTCTCGTAGACCGTGCAACCATGAGCACAATCCCTAA | 346 |
| R6.nc | 301 | GGGTGCTTGCAGTGCCTCCGGAGGCTCTCGTAGACCGTGCAACCATGAGCACAATCCCTAA | 360 |
| R24.nc | 299 | GGGTGCTTGCAGTGCCTCCGGAGGCTCTCGTAGACCGTGCAACCATGAGCACAATCCCTAA | 358 |
| S14j.nc | 299 | GGGTGCTTGCAGTGCCTCCGGAGGCTCTCGTAGACCGTGCAACCATGAGCACAATCCCTAA | 358 |
| HcJ6.nc | 301 | GGGTGCTTGCAGTGCCTCCGGAGGCTCTCGTAGACCGTGCAACCATGAGCACAATCCCTAA | 360 |
| Jfh1.nc | 298 | GGGTGCTTGCAGTGCCTCCGGAGGCTCTCGTAGACCGTGCAACCATGAGCACAATCCCTAA | 357 |
| Jch1.nc | 298 | GGGTGCTTGCAGTGCCTCCGGAGGCTCTCGTAGACCGTGCAACCATGAGCACAATCCCTAA | 357 |
| Jch3.nc | 298 | GGGTGCTTGCAGTGCCTCCGGAGGCTCTCGTAGACCGTGCAACCATGAGCACAATCCCTAA | 357 |
| HcJ8.nc | 299 | GGGTGCTTGCAGTGCCTCCGGAGGCTCTCGTAGACCGTGCAACCATGAGCACAATCCCTAA | 358 |

【図4 (B)】

(B)

| | | | |
|-----------|-----|--|-----|
| Hcv-1.nc | 359 | ACCTCAAGAAAAAACAACGTAACACCAACCGTCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGG | 418 |
| Hcv-bk.nc | 350 | ACCTCAAGAAAAAACAACGTAACACCAACCGTCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGG | 409 |
| Hcv-j.nc | 347 | ACCTCAAGAAAAAACAACGTAACACCAACCGTCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGG | 406 |
| R6.nc | 361 | ACCTCAAGAAAAAACAACGTAACACCAACCGTCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGG | 420 |
| R24.nc | 359 | ACCTCAAGAAAAAACAACGTAACACCAACCGTCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGG | 418 |
| S14j.nc | 359 | ACCTCAAGAAAAAACAACGTAACACCAACCGTCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGG | 418 |
| Hc16.nc | 361 | ACCTCAAGAAAAAACAACGTAACACCAACCGTCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGG | 420 |
| Jfh1.nc | 358 | ACCTCAAGAAAAAACAACGTAACACCAACCGTCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGG | 417 |
| Jch1.nc | 358 | ACCTCAAGAAAAAACAACGTAACACCAACCGTCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGG | 417 |
| Jch3.nc | 358 | ACCTCAAGAAAAAACAACGTAACACCAACCGTCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGG | 417 |
| Hc18.nc | 359 | ACCTCAAGAAAAAACAACGTAACACCAACCGTCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGG | 418 |
| Hcv-1.nc | 419 | TGGCGGTTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTTCGCCGCGCAGGGGCCCTAGATTGGGTGT | 478 |
| Hcv-bk.nc | 410 | TGGCGGTTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTTCGCCGCGCAGGGGCCCTAGATTGGGTGT | 469 |
| Hcv-j.nc | 407 | TGGCGGTTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTTCGCCGCGCAGGGGCCCTAGATTGGGTGT | 466 |
| R6.nc | 421 | TGGCGGTTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTTCGCCGCGCAGGGGCCCTAGATTGGGTGT | 480 |
| R24.nc | 419 | TGGCGGTTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTTCGCCGCGCAGGGGCCCTAGATTGGGTGT | 478 |
| S14j.nc | 419 | TGGCGGTTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTTCGCCGCGCAGGGGCCCTAGATTGGGTGT | 478 |
| Hc16.nc | 421 | TGGCGGTTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTTCGCCGCGCAGGGGCCCTAGATTGGGTGT | 480 |
| Jfh1.nc | 418 | TGGCGGTTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTTCGCCGCGCAGGGGCCCTAGATTGGGTGT | 477 |
| Jch1.nc | 418 | TGGCGGTTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTTCGCCGCGCAGGGGCCCTAGATTGGGTGT | 477 |
| Jch3.nc | 418 | TGGCGGTTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTTCGCCGCGCAGGGGCCCTAGATTGGGTGT | 477 |
| Hc18.nc | 419 | TGGCGGTTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTTCGCCGCGCAGGGGCCCTAGATTGGGTGT | 478 |
| Hcv-1.nc | 479 | GCGCGCGACAGGAAGACTTCC----- | 500 |
| Hcv-bk.nc | 470 | GCGCGCGCGCAGGAAGACTTCCGAGCGGTTCG--- | 500 |
| Hcv-j.nc | 467 | GCGCGCGACTAGGAAGACTTCCGAGCGGTTCGCAA | 500 |
| R6.nc | 481 | GCGCGCGACTAGGAAGACTT----- | 500 |
| R24.nc | 479 | GCGCGCGACAGGAAGACTTCC----- | 500 |
| S14j.nc | 479 | GCGCGCGACAGGAAGACTTCC----- | 500 |
| Hc16.nc | 481 | GCGCGCGACAGGAAGACTTCCG | 500 |
| Jfh1.nc | 478 | GCGCGCGACAGGAAGACTTCCG----- | 500 |
| Jch1.nc | 478 | GCGCGCGACAGGAAGACTTCCG----- | 500 |
| Jch3.nc | 478 | GCGCGCGACAGGAAGACTTCCG----- | 500 |
| Hc18.nc | 479 | GCGCGCGACAGGAAGACTTCT----- | 500 |

【図 5 (A)】

(A)

p-H77J6S

GCGTGTCTCATGCCCGGCCCCGCTGGTTCTGGTTTTGCCTACTCCTGCTCGCTGCAGGGGTAGGCATCTA
CCTCCTCCCCAACCGATGAAGGTTGGGGTAAACACTCCGGCCTCTTAAGCCATTTCCTGTTTTTTTTTTT
TTTTTTTTTTTTTTTTCTTTTTTTTTCTTTCCCTTCCTTTCTTTTTTCCCTTCCTTTTCCCTTCCTT
AATGGTGGCTCCATCTTAGCCCTAGTCACGGCTAGCTGTGAAAGGTCCGTGAGCCGCATGACTGCAGAGA
GTGCTGATACTGGCCTCTCTGCAGATCATGT (配列番号 1 2)

R6

GTCCAGCTGGTTCGTGGCTGGTTACAGCGGGGAGACATATATCACAGCCTGTCTCGTGCCCGACCCCGC
TGGTTCATGTTGTGCCTACTCCTACTTTCACTAGGGGTAGGCATCTACCTGCTCCCCAACCGATAAACGG
GGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCATTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTTT
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTCTTTTGTTTTTTTTTTTTTCTTTCTTTTGGTGGCT
CCATCTTAGCCCTAGTCACGGCTAGCTGTGAAAGGTCCGTGAGCCGCATGACTGCAGAGAGTGCTGATAC
TGGCCTCTCTGCAGATCATGT (配列番号 1 3)

R24L

TGGCGCGTGAAGACCAAGCTCAAACCTCACTCCATTGCCGGAAGCGCGCCTCCTGGATTTATCCAGCTGGT
TCACTGTGCGCGCGCGCGGGGGGACATTTATCACAGCGTGCCGCGTGCCCGACCCCGCTTATTACTCCT
TGGCCTACTCCTACTTTTTGTAGGGGTAGGCCTTTTCCTACTCCCCGCTCGGTAGAGCGGCACACATTAG
CTACACTCCATAGCTAACTGTCCCTTTTTTTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTTTT
TTTTTTTTTTTTTGTTCCTTTCTCATTTCCTTCTTATCTTAATTACTTCCTTCCTGGTGGCTCC
ATCTTAGCCCTAGTCACGGCTAGCTGTGAAAGGTCCGTGAGCCGCATGACTGCAGAGATTGCCGTAACTG
GTATCTCTGCAGATCATGT (配列番号 1 4)

R24S

CCTGGATTTATCCAGCTGGTTCCTGTCGCGCGCGCGGGGGGACATTTATCACAGCGTGCCGCGTGCC
CGACCCCGCTTATTACTCCTTGGCCTACTCCTACTTTTTGTAGGGGTAGGCCTTTTCCTACTCCCCGCTC
GGTAGAGCGGCACACATTAGCTACACTCCATAGCTAACTGTCCCTTTTTTTTTTTTTTTTTGTTTCTTTT
CCTTCTCATTTCCTTCTTATCTTAATTACTTTCTTTCTGGTGGCTCCATCTTAGCCCTAGTCACGGCTA
GCTGTGAAAGGTCCGTGAGCCGCATGACTGCAGAGATTGCCGTAACTGGTATCTCTGCAGATCATGT (配
列番号 1 5)

【図 5 (B)】

(B)

HCJ6CH

TTTATCCAGTTGGTTTACCGTCGGCGCCGGCGGGGGCGACATTTATCACAGCGTGTGCGGTGCCCGACCC
CGCTTATTACTCCTTAGCCTACTCCTACTTTTCGTAGGGGTAGGCCTCTTTTACTCCCCGCTCGGTAGA
GCGGCACACATTAGCTACACTCCATAGCTAACTGTTCCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TTCTTTCCTTCTCACCCTCTTTTACTTCT
TTCCTGGTGGCTCCATCTTAGCCCTAGTCACGGCTAGCTGTGAAAGGTCCGTGAGCCGCATGACTGCAGA
GAGTGCCGTA (配列番号 16)

JFH1

GGACTTATCCAGTTGGTTCACCGTCGGCGCCGGCGGGGGCGACATTTTCACAGCGTGTGCGCGCCCGA
CCCCGCTCATTACTCTTCGGCCTACTCCTACTTTTCGTAGGGGTAGGCCTCTTCCTACTCCCCGCTCGGT
AGAGCGGCACACACTAGGTACACTCCATAGCTAACTGTTCCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TTTTTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTCCCTCTTCTTCCCTTCTCATCTTATTCTACTTTCTTCTT
GGTGGCTCCATCTTAGCCCTAGTCACGGCTAGCTGTGAAAGGTCCGTGAGCCGCATGACTGCAGAGAGTG
CCGTAACCTGGTCTCTCTGCAGATCATGT (配列番号 17)

JCH1

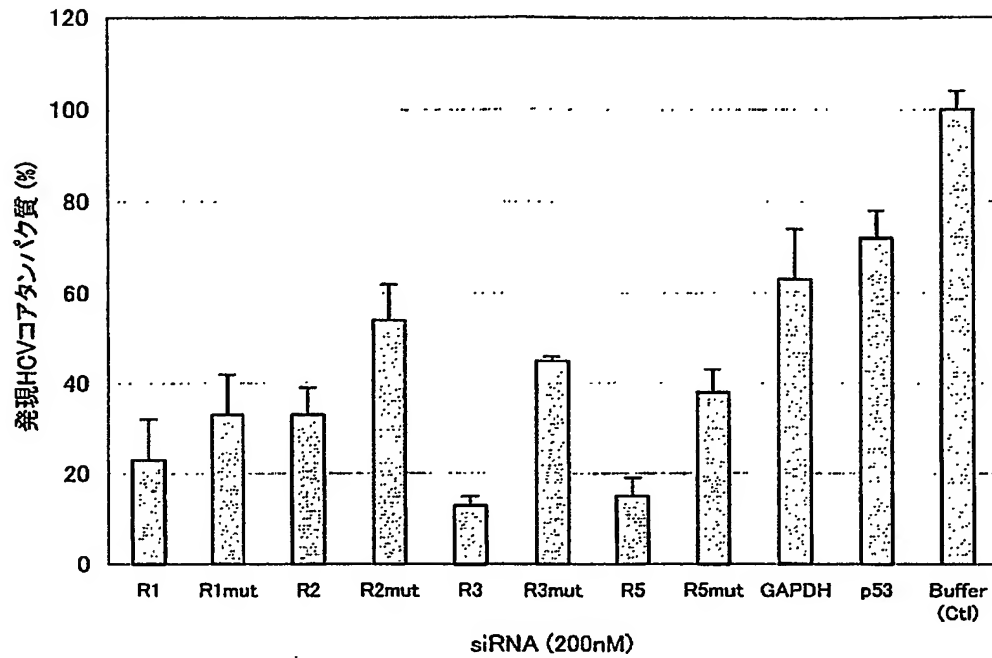
GGATTTGTCCAGTTGGTTTACCGTCGGCGCCGGCGGGGGCGACATTTATCACAGCGTGTGCGGTGCCCGA
CCCCGCTATTACTCCTTAGCCTACTCCTACTTTCTGTAGGGGTAGGCCTCTTCCTACTCCCCGCTCGAT
AGAGCGGCACACATTAGCTACACTCCATAGCTAACTGTTCCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TTTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTCCCTCTTCTTCCCTTCTCATCTTATTCTACTTTCTTCTTGGTG
GCTCCATCTTAGCCCTGGTCACGGCTAGCTGTGAAAGGTCCGTGAGCCGCATGACTGCAGAGAGTGCCGT
AACTGGTCTCTCTGCAGATCATGT (配列番号 18)

2b_AB030907

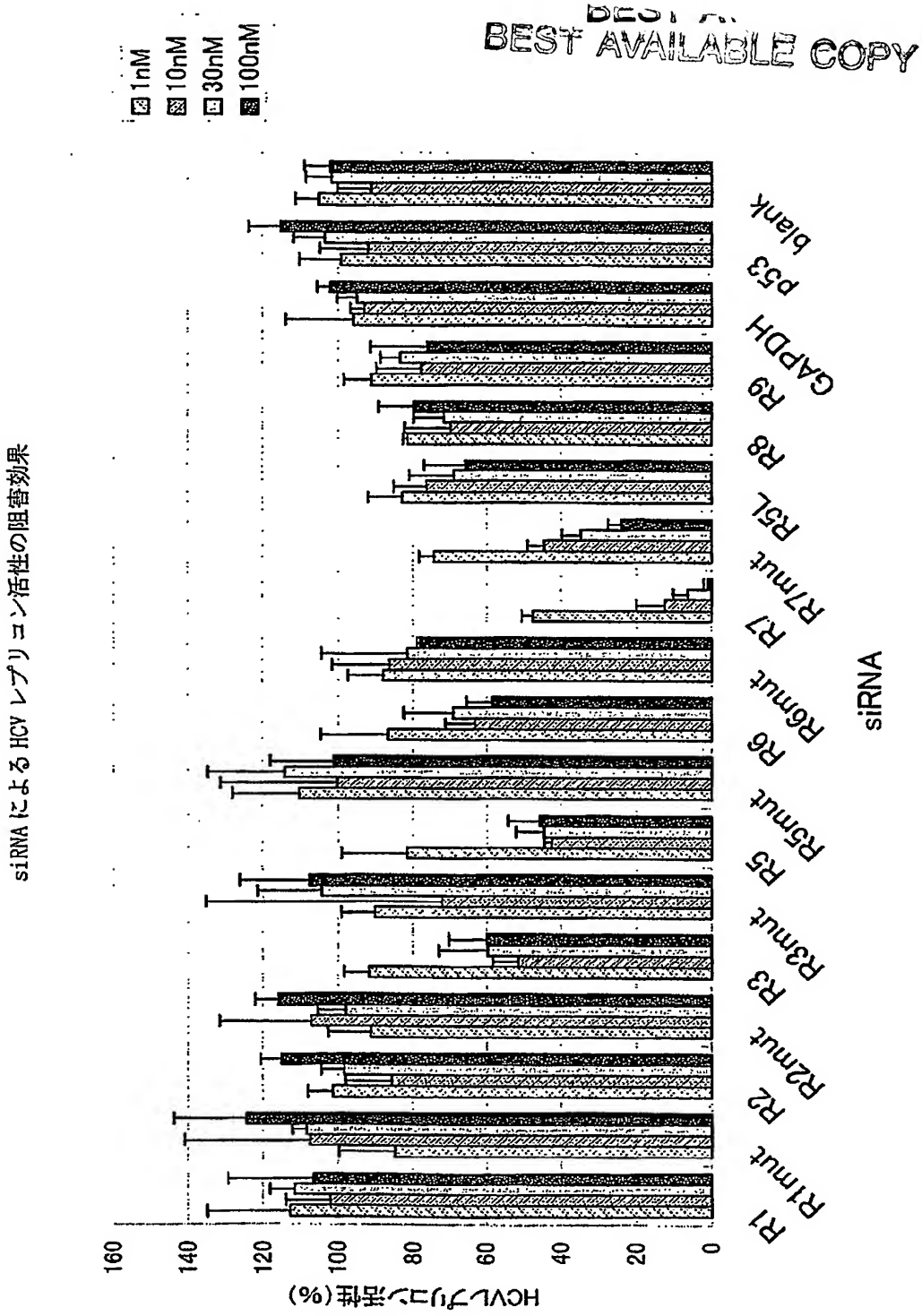
TAGATTTATCCGGGTGGTTCACCGTGGGCGCCGGCGGGGGCGACATCTTTCACAGCGTGTGCGATGCCCG
ACCCCGCTATTACTCCTTTGCCTACTCCTACTTAGCGTAGGAGTAGGCATCTTTTACTCCCCGCTCGG
TAGAGCGGCAAACCTAGCTACACTCCATAGCTAGTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGT
TTTTTTTTTCTCTTTTCCGTATTTTTTTTTTCTCTTTTCTTGGTGGCTCCATCTTAGCCCTAGTC
ACGGCTAGCTGTGAAAGGTCCGTGAGCCGCATGACTGCAGAGAGTGCCGTAACCTGGTCTCTCTGCAGATC
ATGT (配列番号 19)

【図 6】

siRNA による Rz-HepM6 の発現 HCV コアタンパク質の定量



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 感染後のC型肝炎ウイルス（HCV）の確実な治療法を提供する。

【解決手段】 HCVのRNAに対して配列特異的に結合するオリゴリボヌクレオチドまたはペプチド核酸、これらを有効成分とするC型肝炎治療剤を提供する

。

【選択図】 なし

特願 2003-016750

出願人履歴情報

識別番号

[591063394]

1. 変更年月日

2001年10月 9日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都新宿区西新宿二丁目8番1号

氏 名

財団法人 東京都医学研究機構

特願 2003-016750

出願人履歴情報

識別番号

[000003311]

1. 変更年月日

[変更理由]

住所

氏名

1990年 9月 5日

新規登録

東京都北区浮間5丁目5番1号

中外製薬株式会社